

(54) METHOD FOR MANUFACTURING XYLITOL USING CANDIDA TROPICALIS

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is a method for manufacturing xylitol in a high yield, which is used as a sweetener having lower caloric value than sugar and in producing food like sugar-free gum, and is especially useful for diabetics. CONSTITUTION: A method for manufacturing xylitol is comprised of the following steps of: i) inoculating *Candida tropicalis* (ATCC 13803) into YP broth containing 2% glucose and 6% xylose and cultivating the bacteria at pH 6 for 24 hours at 200rpm; and ii) inoculating the bacteria into YP medium containing 2.5-3.5%, preferably 3.1% glucose and 10-15%, preferably 10%, xylose; and iii) cultivating the bacteria at pH 6 at 500-550rpm, preferably 500rpm, at 28-32, preferably 30 deg.C. Wherein, oxygen concentration is controlled to increase the yield of xylitol.

COPYRIGHT 2001 KIPO

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> C12P 19/02	(11) 공개번호 (43) 공개일자	특 1999-0086862 1999년 12월 15일
(21) 출원번호 (22) 출원일자 (71) 출원인	10-1998-0020034 1998년 05월 30일 유연우	
(72) 발명자	서용득 김재한 경기도 수원시 권선구 서둔동 110-5 서진호 경기도 성남시 분당구 서현동 292 효자촌 일광아파트 311동 601호 서진호 경기도 성남시 분당구 서현동 일광아파트 311-601 유연우 서울특별시 강남구 압구정1동 현대아파트 31-1005 김재한 경기도 수원시 권선구 서둔동 110-5	
(74) 대리인	오규원, 장성구	

심사청구 : 있음

(54) 칸디다 트로피칼리스를 이용한 자일리톨의 생산방법

요약

본 발명은 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*)를 이용하여 자일리톨(xylitol)을 고수율 및 고생산성으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도

도7

위세서

도면의 간단한 설명

도 1은 pH에 따른 칸디다 트로피칼리스 배양액의 자일로스 비소속도( $q_p$ ), 자일리톨 비생산속도( $q_r$ ) 및 자일리톨 생산성( $q_p$ )을 나타내는 그래프이다.

도 2는 pH 6인 칸디다 트로피칼리스 배양액의 시간 경과에 따른 자일리톨의 생산성 변화를 나타내는 그래프이다.

도 3은 공기 주입량 및 교반속도에 따른 칸디다 트로피칼리스 배양액의 산소전달속도상수( $K_La$ ) 변화를 나타내는 그래프이다.

도 4는 교반속도 500rpm으로 배양된 칸디다 트로피칼리스 배양액의 시간 경과에 따른 자일리톨의 생산성의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 5는 세포성장기에서 포도당 농도에 따른 칸디다 트로피칼리스 배양액의 균체증가량, 최종 에탄올 농도 및 발효시간을 시뮬레이션한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 자일로스 생물전환기에서 포도당 농도에 따른 칸디다 트로피칼리스 배양액의 균체증가량, 최종 자일리톨 농도 및 발효시간을 시뮬레이션한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 포도당 농도에 따른 칸디다 트로피칼리스 배양액의 총 건조균체중량, 총 발효시간, 생산성을 시뮬레이션한 결과이다.

도 8a 및 8b는 각각 고농도 및 저농도의 자일로스 하에서 자일리톨 생산에 대한 삼투압의 영향을 나타내는 그래프이다.

도 9는 최면식으로 배양된 칸디다 트로피칼리스 배양액의 시간 경과에 따른 건조균체중량, 자일로스 농도, 자일리톨 농도, 포도당 농도 및 pH의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 10은 유기산으로 배양된 칸디다 트로피칼리스 배양액의 시간 경과에 따른 건조중재중량, 자일로스 농도, 자일리톨 농도, 포도당 농도 및 배양액 주입속도의 변화를 나타내는 그래프이다.

#### 발명의 상세한 설명

##### 발명의 목적

##### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 칸디다 트로피칼리스를 이용한 자일리톨의 생산방법에 관한 것이다.

자일리톨은 탄수화물 대사과정의 중간산물로 얻어지는 당알코올로, 설탕과 같은 감미도를 가지면서 설탕보다 낮은 칼로리를 가지고 있어 설탕을 대체하는 고부가가치의 기능성 감미료로 잘 알려져 있다. 특히 자일리톨은 글루코스-6-포스페이트 탈수소효소에 의해 대사되지 않으므로, 이 효소가 결핍된 환자들과 당뇨병 환자들에게 저칼로리 감미료, 의약품 첨가제 등으로 유용하게 사용되고 있다. 또한 이러한 뛰어난 감미도와 저칼로리 외에도  $-153\text{J/g}$ 의 낮은 열역학으로 인해 종래시 증발반응에 의한 시럽 한 맛을 가지고 있어 우유와 같은 식품에도 널리 사용되고 있다.

자일리톨은 자일로스(xyllose)를 환원시켜 얻을 수 있는데, 현재 주로 사용되는 방법은 자일로스를 라니디움(Raney nickel) 촉매하에 수소화 반응시키는 화학적 촉매 반응을 이용하는 것이다. 그러나 이 방법은 원료인 자일로스가 고순도로 정제된 것이어야 하고, 자일리톨의 전환율이 50 내지 60% 정도에 불과하며, 자일로스와 자일리톨이 물리화학적 특성이 유사하여 분리가 어려움에도 불구하고 화학 반응액에 자일로스 및 자일리톨이 혼합되어 있어 반응후 별도의 까다로운 분리공정이 필요하고, 불순물의 생성이 수반되며, 고온 및 고압의 반응 조건 등의 문제점이 있다.

자일리톨을 생산하는 다른 방법으로는 아생물을 이용하는 것이다. 즉, 아생물을 촉매처럼 사용하여 배지 중의 자일로스를 자일리톨로 생물전환시키는 것으로, 이 방법에 따르면 배지로부터 세포막을 통과해 세포내로 수송된 자일로스가 NADPH를 조효소로 사용하는 자일로스 환원효소(XR)에 의해 자일리톨로 전환되고, 이 자일리톨이 세포내에 과량의 축적된 후 세포밖으로 배출된다.

따라서, 이 방법은 원료인 자일로스가 순수 분리된 것이어야 할 필요가 없고, 반응이 종료된 후에 자일리톨의 완전한 소모로 인해 자일로스 및 자일리톨의 까다로운 분리공정이 필요없으며, 상온 및 상압의 온건한 반응 조건 등의 장점이 있다. 특히, 이 방법은 자일로스가 헤미셀룰로스(hemicellulose)의 주요 구성성분으로서 다양 함유되어있는 농분가공, 원상가공 및 식품가공 공정의 폐기물을 원료로 사용할 수 있어, 이들 폐기물의 재활용에도 그 의미가 크다.

한편, 미생물 세포내에서 XR에 의해 전환된 자일리톨 일부는 세포밖으로의 배출과는 다른 경로인 NAD<sup>+</sup>를 조효소로 사용하는 자일리톨 탈수소효소(XDH)에 의해 자일톨로스로 전환되고 이어서 자일톨로스 키나제에 의해 자일톨로스-5-포스페이트로 전환되어 5탄당 인산 경로(pentose phosphate pathway)로 들어가 세포의 성장 및 NADPH를 포함한 에너지의 생산에 기여한다.

따라서, 자일리톨의 수율을 증가시키기 위해서는 이용된 미생물의 세포 농도가 높아야 하고 동시에 자일로스가 세포의 성장에 사용되지 않고 모두 자일리톨로 생물전환되어야 하며, 자일리톨의 생산성을 증가시키기 위해서는 전환된 자일리톨의 세포내 소모량을 XR의 조효소인 NADPH의 재생 및 세포 유지(maintenance) 에너지에 필요한 정도로 최소화하면서 세포의 배출량을 최대화하여야 한다.

현재까지 자일리톨의 생산에 이용된 아생물로는 칸디다 구일렘몬디(Candida guilliermondii), 칸디다 트로피칼리스(Candida tropicalis), 칸디다 파라프실로시스(Candida parapsilosis), 칸디다 벨리디(Candida boidinii), 칸디다 펠리쿠로사(Candida pelliculosa) 등의 칸디다 속의 효모들이 가장 많이 연구되었고, 이외에도 파키솔렌 타노필루스(Pachysolen tannophilus) 등의 효모, 엔테로박테리 리쿠아시엔스(Enterobacter liquefaciens), 코리네박테리움 속(Corynebacterium sp.), 마이코박테리움 스머그마티(Mycobacterium smegmatis) 등의 액티노마이세스, 페니실리움(Penicillium), 아스페르길루스(Aspergillus), 리조푸스(Rhizopus), 글리코리디움 뉴로스포라(Glicoladium Neurospora), 푸시리움 속(Fusarium sp.) 등의 곰팡이가 있다.

본 발명자들은 오량당 발효능력이 우수하고 에탄올보다 자일리톨의 생산능력이 우수한 것으로 잘 알려진 효모인 칸디다 트로피칼리스를 이용하고, 발효 초기에는 포도당을 사용하여 세포농도를 증가시키고 발효 후기에는 세포의 성장이 없이 자일로스를 사용하여 자일리톨로 생물전환하는 2단계 발효방법을 도입하였으며, 전환된 자일리톨의 세포외 배출량을 최대화하는 발효조건을 결정하기 위하여 연구를 거듭하였다.

##### 발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 칸디다 트로피칼리스를 이용하여 자일리톨을 고수율 및 고생산성으로 생산하는 방법을 제공하는 데 있다.

##### 발명의 구성 및 작용

상기 목적에 따라, 본 발명에서는 칸디다 트로피칼리스(ATCC 13603)를 자일로스를 포함하는 배지에서 배양하여 자일리톨을 생산하는 방법이 있어서, 칸디다 트로피칼리스를 2.5 내지 3.5 % (w/v)의 포도당 및 10 내지 15 % (w/v)의 자일로스를 포함하는 배지에서 초기 pH 6, 교반속도 500 내지 550 rpm의 조건하에 배양함을 특징으로 하는 자일리톨의 생산방법을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 명세서에 사용되는 % 는 별도의 언급이 없는 경우 고체/고체는 중량/중량 %, 고체/액체는 중량/무피 %, 그리고 액체/액체는 무피/무피 % 를 각각 나타낸다. 또한 본 명세서에서 사용되는 수율은 배지에 투입되는 자일로스의 양에 대한 생산된 자일리톨의 양이고, 자일로스 비소모속도(specific xylose consumption rate,  $q_x$ )는 단위시간당 1g의 균체가 소모한 자일로스의 양이며, 자일리톨 비생산속도(specific xylitol production rate,  $q_p$ )는 단위시간당 1g의 균체가 생산한 자일리톨의 양이고, 생산성(volumetric productivity,  $Q_p$ )은 단위시간당 자일리톨의 생산량이다.

본 발명의 자일리톨의 생산방법은 다음과 같다.

먼저, 칸디다 트로피칼리스(ATCC 13803)를 통상적인 방법에 따라 점종 증균주를 배양하는데, 예를 들면 2% 포도당과 6% 자일로스가 첨가된 YP 액체배지에 접종하고 30℃, 초기 pH 6에서 24시간 동안 200rpm의 속도로 진탕배양한다.

상기 점종 증균주 배양액을 2.5 내지 3.5 %, 바람직하게는 3.1 % 포도당 및 10 내지 15 %, 바람직하게는 10 %의 자일로스를 포함하는 YP 배지에 접종하고 초기 pH는 6, 교반속도 500 내지 550 rpm, 바람직하게는 500 rpm의 조건하에서 28 내지 32 °C, 바람직하게는 30 °C 하 회분식 또는 유기산으로 분배양한다.

pH는 배지의 pH로서 이윤된 미생물에 따라 다르게 조절하는데, 본 발명에서는 수율 및 자일리톨의 생산성을 향상시키기 위해 초기 pH를 6으로 조절하고 이후에는 pH를 조절하지 않는 방법을 사용한다. 이러한 초기 pH는 칸디다 속의 다른 균주인 칸디다 파라프신로시스 경우의 pH 4.75, 칸디다 구알러르디 경우의 pH 6.0, 칸디다 보이디니 경우의 pH 7.0와는 비교되는 것이다.

한편, 본 발명에서는 자일리톨의 생산 수율을 높이기 위해 배지내 산소농도를 조절한다. 산소는 세포내 탄수화물의 최종 단계에 작용함으로써 미생물에 의한 자일리톨 생산을 조절하는 가장 중요한 조절인자다. 배지내 산소 공급이 1% 이상의 DOT(배지내 산소농도를 백분율로 나타낸 수치)로 충분하면 세포내에서 자일로스로부터 전환된 자일리톨은 축적되지 않고 자일올로스로 전환되어 세포 성장 및 에너지 생산에 소모되어 자일리톨 생산 수율이 감소되며, 산소 공급이 1% 미만의 DOT를 가지는 마이크로-에어로빅(micro-aerobic) 상태로 제한되면 탄수화물 대사 에 의한 에너지 생산이 저해되어 결국 세포생장이 억제되고 자일리톨이 축적되어 세포외로 배출된다. 그러나 자일리톨의 고수율을 위해 산소공급이 지나치게 제한되면 탄소의 흐름이 자일리톨 생산방향으로 진행될지라도 세포 전반의 대사속도가 지연되어 전체적으로는 자일리톨 생산성이 저하된다. 따라서 산소전달상태는 자일리톨 생산에 있어 가장 중요한 인자로, 자일리톨 생산을 최적화하기 위해서는 일정 범위의 산소전달속도로 유지하여야 하지만, 산소전달속도를 DOT 로 직접 조절하기는 매우 어렵다.

본 발명에서는 산소전달속도를 1% 미만의 DOT 상태의 마이크로-에어로빅 상태로 조절하기 위해 500 내지 550 rpm의 교반속도를 사용한다. 바람직한 교반속도는 500rpm( $K_L a = 1.06 \text{분}^{-1}$ )으로, 이 교반속도로 배양된 칸디다 트로피칼리스 배양액에서는 자일리톨의 수율이 0.81g/g로 높고, 세포 성장 및 세포의 기증대사기는 유지에 소모되는 자일로스 양도 적으며, 자일로스 생물전환기에서 자일리톨 비생산속도도 0.3g/g 시로 높다.

일반적으로 미생물은 포도당과 자일로스 중 포도당을 먼저 사용하고 포도당이 고갈된 후에 자일로스를 사용한다. 따라서 상기 배지 조성을 포함하는 본 발명에서는 발효 초기인 제1 단계에서 저장한 포도당을 사용하여 짧은 시간에 칸디다 트로피칼리스를 고농도로 배양하고(이하 '세포성장기'라 함), 발효 후 기인 제2 단계에서 세포의 성장 없이 세포를 촉매처럼 이용하여 고가인 자일로스를 자일리톨로 생물전환한다(이하 '자일로스의 생물전환기'라 함).

포도당은 세포성장기에 세포를 배양하는데 사용되고 일단 포도당이 고갈되면 세포가 자일로스를 자일리톨로 생물전환하기 시작한다. 본 발명에서는 자일리톨의 생산성을 향상시키기 위해, 2.5 내지 3.5 %의 포도당 농도를 사용하여 세포를 단시간 내에 고농도로 배양하는데, 포도당 농도가 3.5 % 이상이면 초기 세포의 농도는 증가되지만 포도당 대사의 부산물로 생성되는 에탄올에 의해 세포의 성장, 증식 및 대사가 저해되어 발효시간이 지연되고 결국 자일리톨의 생산성이 저하되는 단점이 있다. 시뮬레이션 결과에 따르면, 최고 생산성을 보이는 포도당의 농도는 31g/l 이다.

본 발명에서는 회분식 배양 또는 유기식 배양을 사용할 수 있다.

특히, 유기식 배양에서 주입식은 다음과 같다.

(1) 자일로스 비소모속도( $q_x$ )와 자일리톨 비생산속도( $q_p$ )는 상수이다.

수식 1

$$\frac{1}{X_2} \frac{dS_2}{dt} = -q_{S_2} = \text{상수}(constant)$$

수식 2

$$\frac{1}{X_2} \frac{dP_2}{dt} = q_{P_2} = \text{상수}(constant)$$

상기 식에서,  $X_2$ 는 생물전환기에서의 건조균체농도이고,  $S_2$ 는 자일로스 농도이고,  $P_2$ 는 자일리톨 농도이다.

기질인 자일로스와 생산물인 자일리톨 농도의 합이 200g/l 미만일 경우에는 회분식 배양에서와 같이 자

일로스 비소모속도와 자일리들 비생산속도 값이 거의 일정한 상수 값을 가지므로, 이러한 가정을 적용할 수 있다. 또한 기질과 산물 농도의 합이 200g/l 을 초과하는 경우에도 그 농도의 구간별로 일정한 값을 가지므로 이러한 가정으로 주입식을 결정하여도 무리는 없다.

(2) 자일로스의 생물전환기에서 세포 비성장속도( $\mu$ )는 상수이다.

수식 3

$$\frac{1}{X_2} \frac{dX_2}{dt} = \mu = 0.02/\text{시}$$

상기 식에서,  $X_2$ 는 상기 정의된 바와 같다.

실험결과에 따르면, 자일로스 생물전환기의 세포 비성장속도는 매우 낮은 값을 가지며 그 값은 구간 전체에서 상수로 정의하여도 무방하다.

(3) 기질인 자일로스 농도( $S_2$ )와 생산물인 자일리들 농도( $P_2$ )의 합이 200g/l 미만인 되도록 제한한다.

수식 4

$$S_2 + P_2 < 200\text{g/l}$$

(4) 배지내 기질의 자일로스 농도는 100g/l 로 일정하다.

수식 5

$$\frac{dS_2}{dt} = 0$$

$$\therefore S_2 = 100\text{g/l}$$

이러한 조건에서 배지내 자일로스 농도를 일정하게 유지하기 위해, 유기식 배양의 평형(balance)식에서 유도한 주입유액(feeding solution)의 주입식 및 배지내 세포 농도, 총 부피는 다음과 같다.

수식 6

$$V \cdot X = V_g X_g \exp(\mu \cdot t) \quad (1)$$

$$\text{S는상수이므로, } \frac{dS}{dt} = 0$$

$$\therefore \frac{d(VS)}{dt} = V \frac{dS}{dt} + S \frac{dV}{dt} = SF = S_f F - q_s V X$$

$$F = \frac{q_s}{(S_f - S)} V X = \frac{q_s}{(S_f - S)} V_g X_g \exp(\mu \cdot t) \quad (2)$$

$$V = F dt = \frac{q_s}{(S_f - S)} \int (X_g V) dt = \frac{q_s}{(S_f - S)} \cdot V_g X_g [\exp(\mu \cdot t) - 1] \quad (3)$$

$$V \cdot P_2 = q_{P_2} \int (V X_2) dt = \frac{V_g X_g q_{P_2}}{\mu} [\exp(\mu \cdot t) - 1] \quad (4)$$

이러한 주입식에 근거하여, 80% 자일로스 용액을 연동펌프를 사용하여 배지내 자일로스 농도를 8 내지 12 % (w/v)의 범위로 유지하도록 주입한다.

이하, 본 발명을 참고예 및 실시예에 의하여 상세히 설명하나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

참고예 1: 칸디다 트로피칼리스의 배양

칸디다 트로피칼리스(ATCC 13803)를 1% 효모추출물, 2% 박토펩톤, 2% 자일로스 및 2% 현전을 포함하는 평판 배지위에 도말한 후 30℃, 2 일 동안 배양한 후 냉장보관하였다.

이 균주를 2% 포도당이 첨가된 YP 액체배지(1% 효모추출물 및 2% 박토펩톤) 5ml에 접종하고 30℃에서 12 시간동안 200rpm의 속도로 진탕배양한 후, 2% 포도당과 6% 자일로스가 첨가된 YP 액체배지 95ml에 접종하여 30℃, 초기 pH 6에서 24시간 동안 200rpm의 속도로 진탕배양시켜 접종 종균주를 배양하였다.

접종 종균주 배양액을 2% 포도당과 10% 자일로스가 첨가된 YP 배지가 들어있는 2.5 l 발효조(KF5L, 한국 발효기, 한국)에 접종한 후 전배양을 포함하여 조임부피를 1 l 가 되도록 하고 30℃에서 20시간 동안 진탕배양하여 분배양을 하였다. 이때, 초기 접종량은 건조중량 중량 0.5 내지 1g/l 으로, 배양액의 초기 pH는 6으로, 공기 공급은 1vvm으로, 교반속도는 500rpm으로 유지하였다.

균체 농도는 일정시간 간격으로 배양액을 채취한 후 분광광도계(Hitachi U1100, 일본)를 이용하여 600nm 에서 측정할 때 흡광도가 0.1 내지 0.4 가 되도록 희석하여 측정한다 다음 미리 구한 건조중량중량 환산계수(0.227g/l 00)를 곱하여 구하였다.

참고예 2: 당농도의 측정 및 자일로스 비소모속도( $q_s$ ), 자일리들 비생산속도( $q_p$ ) 및 생산성( $Q_p$ )의 결정

포도당 농도는 0-글루코스 정량 키트(영동재약)를 이용하여 측정하였고, 자일로스 및 자일리들의 농도는 탄수화물 분석 컬럼(Waters, 미국)으로 HPLC(TSP, 미국)를 이용하여 측정하였다. 이물질은 상온에서 아세트나이트릴과 이차 용유수를 85:15로 혼합한 용액을 2ml/분의 유속으로 흘리고 RI 검출기를 사용하여 검

출한 결과를 미리 구한 표준 그래프를 이용하여 결정하였다. 유가식 배양시 자일로스의 농도는 3.5-디니트로산리심산(DNS) 방법을 이용하여 측정하였다.

$q_b$ 는 단위시간당 1g의 균체가 소모한 자일로스의 양으로, 발효전과 후의 두 시료의 자일로스 농도 차이와 시간과 평균균체중량으로 나누어 결정하였다.  $q_p$ 는 단위시간당 1g의 균체가 생산한 자일리톨의 양으로, 발효 전과 후의 두 시료의 자일리톨 농도 차이와 시간과 평균균체중량으로 나누어 결정하였다.  $Q_p$ 는 시간당 자일리톨의 생산량으로, 최종 생산된 자일리톨의 농도를 총 발효시간으로 나누어 결정하였다.

참고에 3: 산소전달속도상수( $K_La$ )의 측정

일정량의 공기를 주입하면서 교반속도를 달리할 때의  $K_La$ 는 비정상상태에서의 측정법에 따라, 배지에 질소 가스를 불어넣어 산소를 제거한 다음 공기를 불어넣고 시간에 따른 용존 산소량( $DO$ ) 변화를 측정하고 하기 식을 이용하여 결정하였다.

수식 7

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = K_La(C^* - C_{O_2})$$

상기 식에서  $C_{O_2}$ 는 산소 농도이고,  $C^*$ 는 배지내 포화 용존 산소농도이다.

참고에 4: 최적 pH의 결정

본배양의 초기 본배양중의 배양액 pH를 2N 염산 또는 2N 수산화나트륨을 첨가하여 5, 6, 7 또는 8로 조절한다는 점을 제외하고는 참고에 1에서와 동일한 방법으로 칸디다 트로피칼리스를 배양하고, 참고에 2에서와 동일한 방법으로  $q_b$ ,  $q_p$  및  $Q_p$ 를 결정하였다. 이때 대조구는 본배양의 초기에 pH를 6으로 조절 한 후 배양중에는 조절하지 않은 배양액을 사용하였다.

그 결과는 도 1과 같다. 도 1에서 보듯이, pH 6으로 조절된 배양액의  $q_b$ 와  $q_p$ 는 각각 0.80g/g와 0.41g/g 시이고 배양중의 pH가 조절되지 않은 대조구 배양액의  $q_b$ 와  $q_p$ 는 각각 0.81g/g와 0.40g/g 시로, 두 배양액의  $q_b$ 와  $q_p$ 는 큰 차이가 없다. 따라서 pH를 조절하기 위해 별도로 실험을 첨가할 필요가 없이 초기 pH를 6으로 조절하고 배양중의 pH를 조절하지 않는 것이 최적임을 알 수 있다.

특히 자일로스 생물전환기에서 세포의 비성장속도( $\mu$ )는 0.035 내지 0.04/시로 매우 낮으며, 배양액의 pH에 의한 차이는 거의 없다.

상기 배양액중 pH 6의 칸디다 트로피칼리스 배양액의 시간 경과에 따른 자일리톨의 생산성은 도 2와 같다. 도 2에서 ●는 건조 균체중량(g/l)이고, ■는 포도당 농도(g/l)이고, ▲는 자일로스 농도(g/l)이고, ▼는 에탄올 농도(g/l)이고, ◆는 자일리톨 농도(g/l)이다. 도 2에서 보듯이, 칸디다 트로피칼리스는 본배양이 개시된 후 10시간까지 포도당을 이용하여 세포생장을 하고, 10시간이 경과한 후에 세포의 성장이 억제되면서 배양액중의 자일로스나 자일리톨로 생물전환하며, 이러한 세포생장단계와 자일로스의 생물전환단계는 명확하게 구분된다.  $Q_p$ 는 3.85 g 자일리톨/l 시이다. 한편, 배양 도중에 에탄올이 생성되는데, 이 에탄올은 포도당 대사의 부산물로 생성된 것이며 자일로스의 대사과정에서는 생성되지 않는다.

참고에 5: 최적 교반 속도의 결정

포도당이 첨가되지 않고 10% 자일로스나 첨가된 YP 배지를 사용하고, 공기주입량을 1vvm 또는 2vvm으로 유지하면서 교반속도를 400, 500, 600 또는 700 rpm로 한다는 점을 제외하고는 참고에 1에서와 동일한 방법으로 칸디다 트로피칼리스를 배양하고, 참고에 3에서와 동일한 방법으로  $K_La$ 를 결정하고 시간 경과에 따른 자일리톨 생산성을 결정하였다.

공기 주입량 및 교반속도에 따른  $K_La$ 의 변화는 도 3과 같다. 도 3에서 ○는 1vvm이고, ●는 2vvm이다. 도 3에서 보듯이, 산소전달속도는 통기량보다는 교반속도에 의해 더 큰 영향을 받는다는 점을 알 수 있다.

이중 500rpm으로 배양된 칸디다 트로피칼리스 배양액의 시간 경과에 따른 건조균체중량(g/l, ●), 자일로스 농도(g/l, ▲), 자일리톨 농도(g/l, ◇) 및 DDT(% 중산)의 변화는 도 4와 같다. 도 4에서 보듯이, 칸디다 트로피칼리스는 본배양 초기에 자일로스를 소모하면서 성장하고, DDT가 1% 미만으로 유지되는 마이크로-에어로빅 상태에 도달한 때에는 자일로스나 자일리톨로 전환시킨다.  $Q_p$ 는 3.82g/L 시로 높으나, 자일로스의 일부가 세포의 성장에 소모되어 전체적인 수율이 0.56g/g로 낮다. 교반속도를 증가시켜 배양한 경우에도 결과가 동일하게 나타났다.

400, 500, 600 또는 700 rpm으로 배양된 칸디다 트로피칼리스 배양액의 시간 경과에 따른 자일리톨 생산성을 정리하면, 하기 표 1과 같다.

[표 1]

교반 속도(rpm)	400rpm	500rpm	600rpm	700rpm
자일리톨 수율( $Y_{F/S}$ ) (g/g)	0.68	0.56	0.49	0.34
균체중량 수율( $Y_{X/S}$ ) (g/g)	0.019	0.23	0.30	0.48
유지도( $1-(Y_{F/S}+Y_{X/S})$ ) (g/g)	0.301	0.21	0.21	0.18
자일로스 비소모속도( $a_S$ ) (g/g.시)	0.35	0.57	0.42	0.41
자일리톨 비생산속도( $q_P$ ) (g/g.시)	0.27	0.30	0.22	0.14
비성장속도( $\mu$ ) (시 <sup>-1</sup> )	DOT 1% 미만	0.0056	0.049	0.064
	DOT 1% 이상	-	0.329	0.338
발효 시간 (시)	53	19.5	19.5	19.5
피종 건조균체중량(g/ℓ)	2.64	24.9	32.7	51.5

표 1에서 보듯이, 교반속도가 증가할수록 DOT가 낮은 상태에서도 세포의 비성장속도의 증가로 인해 균체 농도가 증가되어 결국 자일리톨의 생성 수율이 저하되고, 이중 교반속도 400rpm( $K_a=0.484\text{분}^{-1}$ )의 조건으로 배양한 경우에는  $0.0051\text{ 시}^{-1}$ 의 가장 낮은 비성장속도를 보여 세포수의 증가없이 자일리톨의 수율이  $0.68\text{g/g}$ 으로 가장 높음을 알 수 있다.

그러나, 이러한 결과는 자일로스 한가지만을 탄소원으로 사용한 결과이며, 포도당과 자일로스의 두가지 탄소원을 사용하는 2단계 발효 전략에 적용한 경우의 자일로스 생물전환기에서 다시 평가하면, 자일리톨 수율은 500rpm의 경우( $0.62\text{g/g}$ )와 400rpm의 경우( $0.68\text{g/g}$ )의 차이가 거의 없고, 세포의 성장과 에너지 생산에 소모되는 자일로스의 양(유지도)은 500rpm의 경우( $0.21\text{g/g}$ )가 400rpm의 경우( $0.301\text{g/g}$ )보다 적으며, 자일리톨 비생산속도는 500rpm의 경우( $0.3\text{g/g 시}$ )가 400rpm의 경우( $0.27\text{g/g 시}$ )보다 높다는 점을 고려할 때, 최적 교반속도는 500rpm( $K_a=1.06\text{분}^{-1}$ )임을 알 수 있다.

참고예 6: 최적 포도당 농도의 결정

에탄올이 세포성장기에 미치는 영향은 하기 식 (1), (2), (3)으로 나타낸다.

수식 8

$$\frac{1}{X_1} \frac{dx_1}{dt} = \mu_{1\max} \left(1 - \left(\frac{P_1}{P_{1m}}\right)^\alpha\right) \quad (1)$$

상기 식에서  $x_1$ 은 세포성장기에서의 건조균체농도이고,  $P_1$ 은 자일리톨 농도이며,  $\mu_{1\max}$ 은  $0.56\text{ 시}^{-1}$ 이고,  $P_{1m}$ (세포가 성장하지 못하는 임계 에탄올 농도)은  $24.4\text{g/ℓ}$ 이고,  $\alpha$ 는  $0.271$ 이다.

수식 9

$$\frac{1}{X_1} \frac{dS_1}{dt} = -q_{S1} = 0.31 + 0.22\mu(P_1 - 13.5)$$

수식 10

$$\frac{1}{X_1} \frac{dP_1}{dt} = q_{P1} = 0.04 + 0.11\mu(P_1 - 13.5)$$

상기 식에서  $X_1$  및  $P_1$ 은 상기 정의한 바와 같고,  $S_1$ 은 포도당 농도이다.

에탄올이 자일로스 생물전환기에 미치는 영향은 하기식 (4), (5), (6)으로 나타낸다.

수식 11

$$\frac{1}{x_2} \frac{dx_2}{dt} = \mu = 0.03/hr \quad (4)$$

수식 12

$$\frac{1}{x_2} \frac{dS_2}{dt} = -q_{s2} = x_0 + \frac{a}{1 + (\frac{x}{x_0})^b}$$

(5) 상기 식에서, a는 0.41(g/g 시)이고, b는 3.25이고,  $x_0=11.36(g/\ell)$ 이고,  $y_0=0.16(g/g 시)$ 이다.

수식 13

$$\frac{1}{x_2} \frac{dP_2}{dt} = q_{p2} = x_0 + \frac{a}{1 + (\frac{x}{x_0})^b}$$

상기 식에서, a는 0.28(g/g 시)이고, b는 6.89이고,  $x_0=12.19(g/\ell)$ 이고,  $y_0=0.12(g/g 시)$ 이다.

이러한 결과를 토대로, 컴퓨터 시뮬레이션(Sigma Plot program, spss, 미국)을 실시하였다. 이때, 생산성은 실험의 준비시간, 공장 원료비를 고려하지 않고 단순히 생산된 자일리톨의 양을 총 발효시간으로 나눈 값인  $Q_p$ 로 정의하였으며, 총 발효시간은 자일로스 생물전환기의 지체시간(lag time)이 에탄올 농도에 무관하게 일정하다는 가정하에 세포성장기의 소요시간과 자일로스 생물전환기의 소요시간의 합으로 나타내었다.

수식 14

$$Q_p = \frac{P_{2f}}{t_{total}} = \frac{P_{2f}}{(t_1+t_2)} \quad (7)$$

즉, 초기 자일로스 농도( $S_0$ ) 100g/ℓ, 초기 에탄올 농도( $P_0(EtOH)$ ) 0g/ℓ, 초기 자일리톨 농도( $P_0(XOH)$ ) 0g/ℓ 및 초기 균체중량( $X_0$ ) 1g/ℓ의 초기 조건하에서, 포도당 농도( $S_i$ )를 5 내지 100g/ℓ의 범위로 변화시켜 가면서 4차 런지-쿠타(Lunge-Kutta) 방법에 따라 미분방정식을 수치해석하여, 포도당 농도에 따른 세포성장기의 최종 균체중량, 최종 에탄올 농도 및 발효시간을 시뮬레이션하였다.

그 결과는 도 5와 같으며, 도 5에서 ----은 세포성장기의 균체중량( $X_i$ )이고, 점선은 세포성장기의 최종 에탄올 농도( $P_i(EtOH)$ )이며, 실선은 세포성장기에 소요되는 발효시간( $t_1$ )이다.

도 5의 결과를 초기조건으로 자일로스 생물전환기의 균체중량, 최종 에탄올 농도 및 발효시간을 시뮬레이션한 결과는 도 6과 같으며, 도 6에서 점선은 자일로스 생물전환기에서 생성된 균체중량( $X_2$ )이고, ----은 자일로스 생물전환기의 최종 자일리톨 농도( $P_2(XOH)$ )이며, 실선은 자일로스 생물전환기에 소요되는 발효시간( $t_2$ )이다. 도 6에서 보듯이, 최종 자일리톨 농도는 포도당 농도 34g/ℓ인 때에 84.3g/ℓ로 가장 높다.

세포성장기를 나타내는 도 5와 자일로스 생물전환기를 나타내는 도 6을 종합하여, 포도당 농도에 따른 칸디다 트로피칼리스 배양액의 균체중량, 발효시간 및 최종 생산성을 시뮬레이션한 결과는 도 7과 같으며, 도 7에서 실선은 최종 생산성( $Q_p$ )이고, 점선은 총 균체중량( $X_{total}$ )이고, ----은 총 발효시간이다. 도 7에서 보듯이, 발효시간은 포도당 농도 23g/ℓ인 때에 21.8시간으로 가장 적다. 자일리톨 생산성은 포도당의 농도 31g/ℓ인 때에 가장 높은 것으로 나타나 최적의 초기 포도당 농도는 31g/ℓ임을 알 수 있다.

참고예 7: 초기 자일로스 농도의 결정

YP 배지에 첨가되는 자일로스의 초기 농도를 50, 100, 200 또는 300g/ℓ로 한다는 점을 제외하고는 참고예 1에서와 동일한 방법으로 배양하고, 수율, 자일로스 비소모속도 및 자일리톨 비생산속도를 측정하였다.

그 결과는 하기 표 2와 같다.

[표 2]

초기 자일로스 농도 (g/ℓ)	50	100	200	300
자일리톨 수율( $Y_{ps}$ ) (g/g)	0.59	0.81	0.77	0.46
자일로스 비소모속도( $q_s$ ) (g/g 시)	0.34	0.51	0.37	0.13
자일리톨 비생산속도( $q_p$ ) (g/g 시)	0.19	0.41	0.27	0.05

표 2에서 보듯이, 초기 자일로스 농도가 100g/ℓ인 경우에 수율, 비소모 속도 및 자일리톨의 비생산속도



가 모두 가장 높다는 점을 알 수 있다.

참고에 8: 삼투압의 영향

고농도의 자일로스 하에서 자일리톨에 의한 삼투압의 자일리톨 생산에 대한 영향을 조사하기 위해, 자일로스 120g/l, 자일로스 120g/l과 자일리톨 50g/l, 자일로스 120g/l과 자일리톨 100g/l 또는 자일로스 120g/l과 자일리톨 200g/l을 포함하는 YP 배지를 사용한다는 점을 제외하고 참고에 1에서와 동일한 방법으로 칸디다 트로피칼리스를 배양하고, 비성장속도, 수율, 자일로스 비소모속도 및 자일리톨 비성장속도를 측정하였다. 그 결과는 도 8a와 같다.

또한 저농도의 자일로스 하에서 자일리톨에 의한 삼투압의 자일리톨 생산에 대한 영향을 조사하기 위해, 자일리톨 30g/l, 자일로스 30g/l과 자일리톨 50g/l, 자일로스 30g/l과 자일리톨 100g/l, 또는 자일로스 30g/l과 자일리톨 200g/l을 포함하는 YP 배지를 사용한다는 점을 제외하고 참고에 1에서와 동일한 방법으로 칸디다 트로피칼리스를 배양하고, 비성장속도, 수율, 자일로스 비소모속도 및 자일리톨 비성장속도를 측정하였다. 그 결과는 도 8b와 같다.

도 8a 및 8b에서 보듯이, 저농도 자일로스 및 고농도의 자일로스의 조건하에서 모두 자일리톨 농도가 증가함에 따라 자일로스 비소모속도, 자일리톨 비성장속도 및 수율이 모두 감소하고, 특히 자일리톨 비성장속도가 현저하게 감소한다. 또한 자일리톨 농도가 동일한 경우에는 자일리톨 농도에 무관하게 자일로스 농도가 높을수록 자일리톨 비성장속도가 현저하게 감소한다. 이로부터 삼투압은 전반적인 자일로스 대사속도를 감소시키지만 세포내 자일로스 흡수를 변화시키지 못한다는 점을 알 수 있다. 또한 배지중 자일로스 및 자일리톨 농도의 란이 동일한 경우에도 자일리톨의 양이 증가함에 따라 자일리톨의 생산이 현저하게 저해된다. 또한 배지중 기질인 자일로스와 생산물인 자일리톨 농도의 총합을 일정하게 유지하여도 자일로스의 농도가 낮고 자일리톨의 농도가 증가함에 따라 자일리톨 생산속도가 떨어짐을 알 수 있다. 따라서 유기산 배양의 경우에는 자일로스의 농도는 삼투압에 미치는 영향이 미미하여 배양을 할 수 있다.

또한 배지내 자일리톨의 농도를 100g/l로 유지하면서 유기산 배양의 결과, 배지내 자일리톨의 농도가 증가함에 따라 자일로스 비소모속도와 자일리톨 비성장속도가 모두 감소하였다. 자일로스 비소모속도와 자일리톨 비성장속도가 감소하지 않아 생산성이 유지되는 범위는 배지내 자일로스 및 자일리톨의 농도의 합이 200g/l 이하의 범위임을 알 수 있다.

실시예 1: 회분식 배양

참고에 1에서와 동일한 방법으로 칸디다 트로피칼리스를 회분식 배양하고, 시간 경과에 따른 건조균체중량, 자일로스 농도, 자일리톨 농도, 포도당 농도 및 pH의 변화를 조사하였다.

그 결과는 도 9와 같다. 도 9에서 ●는 건조 균체중량(g/l)의 로그값이고, ▲는 자일로스 농도(g/l)이고, ◇는 자일리톨 농도(g/l)이고, ■는 포도당 농도(g/l)이고, 점선은 pH이다. 도 9에서 보듯이, 회분식 배양시 자일리톨이 0.81g/g의 수율 및 5.1g/l 시의 생산성으로 얻어진다. 본 배양이 시작된 후 8시간 동안 포도당을 소모하면서 세포가 성장하는 세포성장단계이고, 이 과정중 배양액의 pH는 초기 6에서 4.5까지 낮아진다. 포도당이 완전히 소모된 후 세포의 성장이 없어 자일로스를 자일리톨로 높은 수율로 전환하는 자일리톨 생산단계가 이어지며 이는 건조균체중량 변화에서 확연히 나타난다. 자일로스의 자일리톨로의 전환단계에서는 자일리톨 이외의 부산물의 생성은 관찰되지 않았고 pH도 4.5로 유지된다.

실시예 2: 유기식 배양

60% 자일로스 용액을 연동플렉스(Masterflex, 미국)를 사용하여 배지내 자일로스 농도 80 내지 120g/l의 범위로 유지한다는 점을 제외하고는, 참고에 1에서와 동일한 방법으로 칸디다 트로피칼리스를 유기식 배양하였다. 각각의 배양액의 시간 경과에 따른 건조균체중량, 자일로스 농도, 자일리톨 농도, 포도당 농도 및 자일로스 주입속도의 변화를 조사하였다.

그 결과는 도 10과 같다. 도 10에서 ●는 건조균체중량(g/l)의 로그값이고 ◇는 자일리톨 농도(g/l)이고 ■는 포도당 농도(g/l)이고 ▲는 자일로스 농도(g/l)이고 점선은 자일로스 주입속도(ml/hr)이다. 도 10에서 보듯이, 유기식 배양시 자일리톨이 0.76g/g의 수율 및 4.0g/l 시의 생산성으로 얻어진다.

#### 발명의 효과

본 발명의 방법에 따르면, 칸디다 트로피칼리스를 이용하여 자일리톨이 고수율 및 고생산성으로 생산된다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1

칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*)를 자일로스를 포함하는 배지에서 배양하여 자일리톨을 제조하는 방법에 있어서, 칸디다 트로피칼리스를 2.5 내지 3.5 % (w/v)의 포도당 및 10 내지 15 % (w/v)의 자일로스를 포함하는 배지에서 초기 pH 6, 교반속도 500 내지 550 rpm의 조건하에 배양함을 특징으로 하는 자일리톨의 생산방법.

##### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 포도당 농도가 3.1 % (w/v)인 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 자일로스 농도가 10 %(w/v)인 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 교반속도가 500 rpm인 방법.

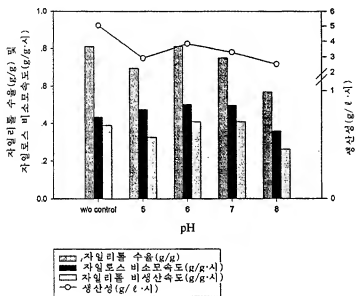
청구항 5

제 1 항에 있어서,

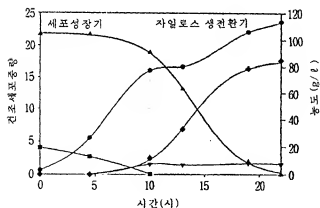
상기 배양이 배지나 자일로스 농도를 8 내지 12 %(w/v)으로 유지하면서 유가식 배양하는 것인 방법.

도면

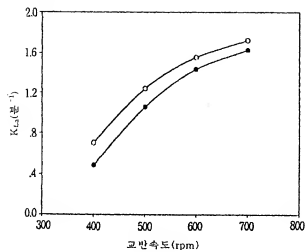
도면1



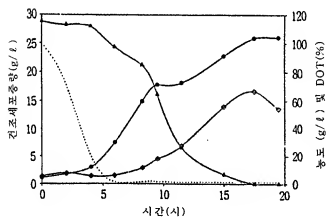
도면2



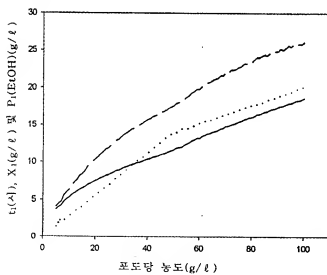
도면3



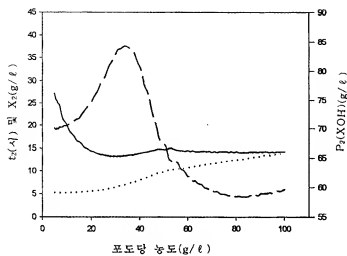
도면4



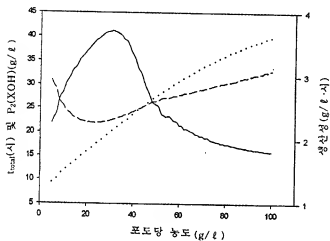
도면5



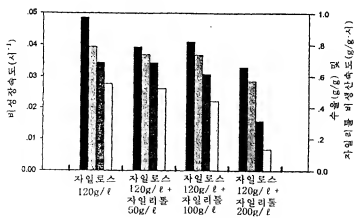
도면6



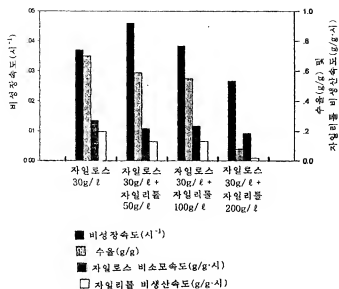
도면7



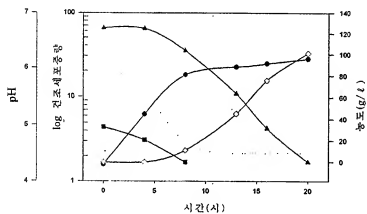
도면8a



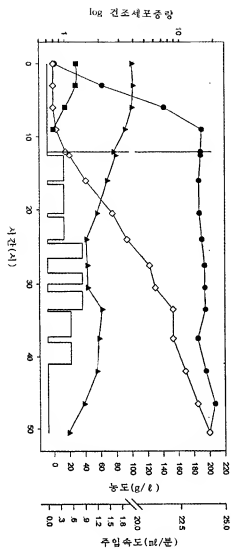
도면8b



도면9



도면 10





## Technical Data Media

<b>YP Broth (Powder)</b>  <b>Y2068</b> <b><i>Molecular Biology Grade</i></b>  Storage RT/4°C   Shipping RT	<b>Components shown as g/liter</b>  <table> <tr> <td>Peptone</td><td>20g</td></tr> <tr> <td>Yeast Extract</td><td>10g</td></tr> <tr> <td><b>Total:</b></td><td><b>30g/L</b></td></tr> </table> 500g makes 16.7 liters	Peptone	20g	Yeast Extract	10g	<b>Total:</b>	<b>30g/L</b>
Peptone	20g						
Yeast Extract	10g						
<b>Total:</b>	<b>30g/L</b>						
Appearance: <b>Important Note:</b> This product as supplied is intended for research use only, not for use in human, therapeutic or diagnostic applications without the expressed written authorization of United States Biological.  <b>Important Note:</b> This product as supplied is intended for research use only, not for use in human, therapeutic or diagnostic applications without the expressed written authorization of United States Biological.							

**United States Biological - P.O Box 261 - Swampscott, Massachusetts 01907**  
**800-520-3011   - Fax: 781-639-1768 - chemicals@usbio.net - www.usbio.net**